

**ANALISIS SEKUEN GEN laten membrane protein 2A (Im 2A)  
Epstein-Barr Virus BAGIAN EPITOP Cytotoxic T Lymphocyte  
(CTL) PADA KARSINOMA NASOFARING**

**ANALYSIS OF A GENE SEQUENCE OF latent membrane protein  
2A (Imp 2A) Epstein-Barr Virus AT Cytotoxic T- Lymphocyte  
(CTL) EPITOPE OF NASOPHARYNGEAL CARCINOMA**

**Nurul Wiqoyah<sup>1</sup>, Marsetyawan HNE<sup>2</sup>, Sofia Mubarika<sup>2</sup>**

**Program Studi Bioteknologi  
Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada**

**ABSTRACT**

*Epstein-Barr Virus* (EBV) is one of the etiological agents for Nasopharyngeal Carcinoma (NPC). The incidence rate of NPC at Sardjito Hospital Yogyakarta seems to increase yearly. EBV effects B lymphocyte leading to lymphoblastoid Cell Line (LCL) *in vitro*, and it express several antigens; one of them is known as a Latent Membrane Protein 2A (LMP 2A).

LMP 2A is potential target of CTL that controls immune response in NPC. CTL plays an important role in selluier immune reponse by recognizing an epitope-HLA class I complex expressed on target cell surface. Evade immune response by the virus causes persistent infection to the host. This evade immune response is due to alteration of amino acid sequence at certain epitope recognized by CTL. Previous data on HLA typing of both NPC patients and healthy controls showed a possession of HLA-A2, HLA-A11 and HLA-A24.

The study was aimed at investigating the LMP 2A gene of EBV at CTL epitope that restricted HLA-A24 (TYGPVFMCL epitope) of NPC. Step of studies were preparing LCL, isolation of DNA, LMP 2A gene amplification related to HLA-A24- restricted CTL epitope followed by sequencing prosedure.

1. Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
2. Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Five samples showed nucleotide changes of LMP 2A gene at CTL epitopes compared to Prototype (B 95.8). Four sample showed nucleotide change, namely G to C encoding amino acid cysteine to serine at 8 position of TYGPVFMCL epitope. One of 5 EBV isolates showed nucleotide change from A to G, T to C, and TC to CG encoding amino acid methionine to valine, cysteine to serine and leucine to proline at 7,8,9 position of TYGPVFMCL epitope, respectively.

**Keywords:** Nasopharyngeal Carcinoma, Epstein-Barr Virus, LMP 2A, CTL epitope.

## PENGANTAR

Karsinoma Nasofaring (KNF) adalah suatu tumor yang menyerang daerah kepala dan leher. KNF umum dijumpai atau bersifat endemik di Cina Selatan; (Coy *et al.*, 1992). KNF juga ditemukan dengan tingkat insidensi tinggi di Asia Tenggara terutama Singapura dan Taiwan. Di Indonesia, KNF merupakan jenis tumor di daerah kepala dan leher yang paling sering ditemukan. Menurut data patologi, KNF menduduki urutan kedua untuk penderita laki-laki dan urutan kedelapan untuk penderita wanita di Indonesia. (Munir, 1996; Roezin, 1998). Di Yogyakarta, KNF menduduki urutan pertama pada laki-laki, dan urutan ke tiga pada wanita (Soeripto *et al.*, 1976), sedangkan di RS. Sardjito Yogyakarta, kasus KNF setiap tahun meningkat, yaitu dari 48 orang pada tahun 1992, menjadi 58 orang pada tahun 1993 dan 63 orang pada tahun 1994. *Epstein-Barr Virus* (EBV) terbukti berkaitan erat dengan penyebab keganasan, seperti kanker nasofaring (KNF) (Khanna *et al.*, 1996; Kienzie *et al.*, 1998; Murray *et al.*, 1995). Infeksi EBV menyerang lebih dari 90% penduduk di seluruh dunia. Tamura *et al.*, (1996) melaporkan bahwa penderita KNF yang positif EBV menunjukkan rendahnya respon imun seluler T. *Cytotoxic T Lymphocyte* yang memainkan peranan penting dalam mencegah proliferasi sel B yang terinfeksi EBV dengan cara mengenali epitop peptida yang hanya berikatan dengan molekul *Human Leucocyte Antigen* (HLA) kelas I pada permukaan sel target (Kanna *et al.*, 1997). *Cytotoxic T Lymphocyte* tidak dapat mengenali epitop yang berasosiasi dengan HLA kelas I mungkin karena adanya perubahan sekuens asam amino pada epitop itu (Khanna *et al.*, 1996), atau karena gangguan regulasi (*down regulation*) *Transporter Antigen Protein* I dan II (TAP I dan TAP2) sehingga jumlah kompleks MHC-epitop pada permukaan sel target berkurang (terbatas).

*Latent Membrane Protein 2A* (LMP2A) merupakan salah satu antigen laten yang diekspresikan limfosit B yang terinfeksi EBV

(Apolloni et al., 1992), bersifat imunogenik dan merupakan target utama bagi *Cytotoxic T Lymphocyte* (CTL) pada KNF (Moss et al., 1996; Khanna et al., 1996). *Latent Membrane Protein 2A* (LMP2A) diproses secara endogen dan dimunculkan pada permukaan sel target dalam bentuk kompleks HLA-epitop untuk dikenali oleh CTL. Pemrosesan LMP2A berlangsung melalui mekanisme yang tidak dipengaruhi oleh protein TAP (*TAP-independent mechanism*). Khanna et al., (1996) melaporkan bahwa CTL mengenali epitop LMP2A rekombinan yang berasosiasi dengan HLA-A2 pada sel tumor yang mengalami gangguan regulasi protein TAP, sehingga kemungkinan isolat virus ini menghindari respon imun melalui perubahan sekuen asam amino pada epitop CTL (Khanna et al., 1997).

Lee et al. (1996) melaporkan adanya perubahan sekuen nukleotida pada gen epitop CTL yang terkait dengan HLA-A2.1 dan menyandi asam amino yang berbeda pada posisi 1 epitop CTL LMP2A isolat EBV di Asia Tenggara. Selain EBV, berbagai faktor penyebab KNF telah ditemukan, diantaranya adalah genetik (Roezin, 1999; Kanna et al., 1997).

Beberapa HLA-A, diantaranya HLA-A24, banyak terdapat pada populasi Asia Tenggara dan Caucasia (Rickinson et al., 1997). Penelitian pendahuluan kelompok EBV Australia dan Yogyakarta menunjukkan bahwa dari 9 orang, baik pada orang sehat maupun penderita KNF dari RS. Sardjito, Yogyakarta banyak ditemukan tipe HLA-A24. Orang Indonesia asli yang mempunyai HLA-A24 kemungkinan mempunyai risiko tinggi terkena KNF. Dari data-data tersebut di atas, kemungkinan terdapat perbedaan sekuen gen LMP2A EBV pada bagian epitop CTL yang terkait dengan HLA-A24 dibandingkan dengan epitop CTL LMP2A EBV yang terkait HLA-A24 di daerah yang penduduknya mempunyai HLA-A umum selain HLA-A24.

## CARA PENELITIAN

Bahan yang digunakan adalah darah tepi orang sehat sebagai kontrol dan penderita KNF yang berobat di RSU Dr. Sardjito yang telah diuji secara klinis dan patologi anatomi, lalu dilakukan uji serologi untuk menentukan seropositif EBV, bahan untuk isolasi DNA, kultur limfosit, reagensia PCR, bufer, agarose, dan reagensia sekuensing. Alat yang digunakan adalah sentrifus, *Laminar Flow Hood*, *CO<sub>2</sub> incubator*, *Thermocycler*, seperangkat alat elektroforesis, *shaking incubator*, mikropipet, pipet pasteur, ELISA reader, dan  $\beta$  Counter.

Metode yang digunakan meliputi isolasi limfosit untuk pembuatan *Lymphoblastoid Cell Line* (LCL), isolasi DNA dari darah dan LCL kemudian amplifikasi DNA dan sekuensing .

Limfosit diisolasi dengan menggunakan ficoll-paque. Sebanyak 10 mL darah ditambah 10 mL RPMI 1640 dengan perbandingan 1:1. Campuran darah itu dimasukkan ke dalam tabung konikal yang berisi 10 mL ficol-paque dan disentrifugasi dengan kecepatan 750x g pada suhu 4°C selama 20 menit. *Buffycoat* yang diperoleh dicuci 2-3 kali dengan RPMI 1640 dengan sentrifugasi 750x g pada suhu 4°C selama 10 menit. Setelah supernatan dibuang, pelet dicuci kembali dengan RPMI 1640 dengan kecepatan sentrifugasi dan waktu yang sama. Kemudian pelet diresuspensikan pada medium pertumbuhan, dihitung, dan dikultur untuk pembuatan *Spontaneous Lymphoblastoid Cell Line* (LCL).

Suspensi Limfosit ditumbuhkan pada medium pertumbuhan (RPMI 1640, 1% Penicillin streptomycin atau kanamycin, 1% fungizone, 10% FBS) yang mengandung 0,01 µg/mL FK506. Medium diganti satu kali seminggu hingga terbentuk *Spontaneous Cell Line*. Selanjutnya LCL dipelihara dengan medium pertumbuhan. Kultur diinkubasi di dalam 5% CO<sub>2</sub> inkubator pada suhu 37°C.

Prosedur isolasi DNA mengikuti prosedur yang terdapat di beberapa pustaka dengan modifikasi (Innis and Gelfand, 1990; Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1996). DNA diisolasi dari darah tepi penderita KNF dan donor sehat dan dari *Lymphoblastoid Cell Line* (LCL)

Sebanyak 5 cc darah tepi ditambah 4 cc bufer lisis, dan dikocok kuat dengan *shaker* selama 15 menit, kemudian ditambah ss-phenol dengan perbandingan 1:1 dan dikocok kuat dengan *shaker* selama 10 menit, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1900x g selama 20 menit pada suhu 20°C. Supernatan dimasukkan ke dalam tabung baru dan ditambah 3M Na-asetat sebanyak 1/10 volume supernatan dan etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dari volume akhir. Tabung dibolak balik sehingga didapatkan benang DNA atau disentrifugasi pada kecepatan 1900x g selama 20 menit pada suhu 20°C. Selanjutnya, Pelet ditambah 1 mL buffer C 1x, didiamkan semalam pada suhu 4°C hingga larut, lalu ditambah 7,5 µL RNase (10 mg/mL), diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, ditambah 10 µL 10% SDS dan 50 µL pronase (0,4 mg/ mL), dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam, kemudian ditambah 1,6 mL ss-phenol dan dikocok kuat dengan *shaker* selama 10 menit, disentrifugasi pada kecepatan 1900x g , 20°C selama 20 menit. Supernatan bagian atas diambil dan ditambah 1/10 volume 3M Na-asetat dan etanol absolut dingin dengan rasio 1:1 dari volume akhir. Setelah tabung dibolak balik, tampak benang DNA dan kemudian dipindahkan ke ependorf

berisi 1 mL etanol 70% dan selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan rpm selama 5 menit. Kemudian, pelet dilarutkan dalam bufer TE 1X ( 10mM TrisCl , 1mM EDTA ) dan disimpan di freezer (-20°C).

Isolasi DNA dari LCL diekstraksi dengan sentrifugasi 500x g selama 5 menit. Kemudian pelet diresuspensikan dengan 1-10 mL PBS dingin dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 500x g selama 5 menit sebanyak 2 kali. Pelet ditambahkan 1x volume *digestion* bufer dan selanjutnya diinkubasi dengan pengocokan pada suhu 50°C selama 12 sampai 18 jam. Fenol: *Chloroform Isoamil Alcohol* (CIAA) (24:24:1) ditambahkan ke dalam campuran, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1700x g selama 10 menit. Bagian akuos diambil dan dipindahkan ke tabung baru. Selanjutnya ditambah 7,5 mL Amonium asetat dan 2x volume 100% etanol ditambahkan dan disentrifugasi dengan kecepatan 1700x g selama 2 menit. Pelet dicuci dengan 70% etanol dan dikeringkan, kemudian diresuspensi dengan bufer TE ( 10 mM TrisCl. PH 7,4 , 1mM EDTA pH 8,0). Selanjutnya, penghilangan RNA dan presipitasi etanol dilakukan sama seperti pada darah.

Amplifikasi DNA dilakukan dengan *Thermocycler*. Gen yang akan diamplifikasi adalah gen, pada bagian epitop CTL yang terkait HLA-A2 (epitop CLGGLTMV). *Primer* yang digunakan untuk epitop CLGGLTMV dan epitop TYGPVFMCL adalah *Primer*.:*Forward primer*: 5'CATTCTTGCTATCCTGA CCG3' dan *Reverse primer*: 5'CTCCTCACTTTCCAGTGTAAGG3' dengan produk PCR 324 bp. Reaksi PCR dibuat dalam volume 25 µL.

Suhu *annealing* didasarkan pada nilai Tm dari *primer* dengan menghitung kandungan basa GC dan basa AT pada kedua *primer*. Campuran PCR yang digunakan adalah 10 x bufer PCR (500 mM KCl, 100mM Tris-Cl pH 8,4, 1 mg/ mL gelatin), larutan dNTP yang terdiri atas ATP, dCTP, dGTP, dan dTTP dengan konsentrasi masing-masing 200 µM, MgCl pada konsentrasi 20 mM, 25 mM, 30 mM, satu pasang *primer* dengan konsentrasi masing masing 400 µM, campuran enzim (*Taq DNA polimerase* 0,5 unit/mL dalam H<sub>2</sub>O yang mengandung bufer BSA). *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan dengan mesin PCR (*termocycler*) merk *Eppendorf* tipe 5330. Kemudian, hasil PCR diamati dengan gel agarose pada konsentrasi 2% yang mengandung *etidium bromide* 0,5 µg/ mL dan dielektroforesis dalam bufer TBE (Tris 0,089 M, *Boric acid* 0,089 M, dan *EDTA* 0,002 M). Selanjutnya, dilakukan sekuensing dengan *ABI Prism machine* di Lembaga Eijkman Jakarta. Volume dan konsentrasi yang diperlukan adalah 100 µL dengan konsentrasi 200 ng/mL.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

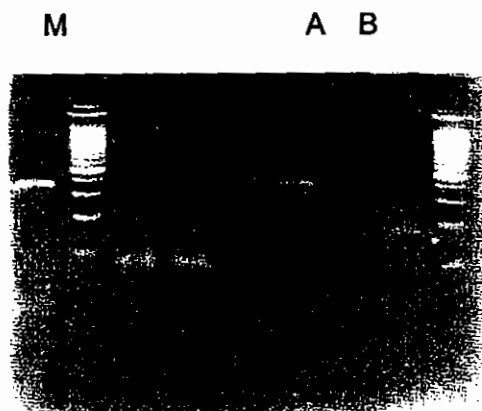
Hasil isolasi DNA menunjukkan konsentrasi DNA dari darah lebih besar daripada konsentrasi DNA dari kultur, mungkin karena adanya sel-sel lain selain sel limfosit di dalam darah yang mempunyai inti, sedangkan kultur hanya mengandung limfosit saja. Selanjutnya, dilakukan amplifikasi gen pada epitop CTL dengan PCR dengan optimasi PCR yang telah dilakukan sebelumnya seperti pada tabel 1.

Tabel 1. kondisi PCR optimal untuk epitop TYGPVFMCL

	Epitop	Waktu (menit)
Pre denaturasi ( <i>Hot star</i> )	95°C	5,00
Denaturasi	94°C	1,00
<i>Annealing</i>	54°C	0,50
<i>Extention</i>	72°C	1,00
<i>Extra extention</i>	72°C	5,00

Jumlah siklus PCR : 30-35 siklus.

Produk PCR epitop TYGPVFMCL adalah 324 bp (Gambar 1).



Gambar 1. Amplifikasi gen LMP2A pada epitop CTL TYGPVFMCL (M). Marker 200 bp (A) dan (B) epitop TYGPVFMCL sebesar 324 bp, suhu *annealing* 54°C.

Amplifikasi gen sampel darah secara keseluruhan lebih sulit dibandingkan dengan sampel yang berasal dari LCL terutama epitop gabungan, meskipun konsentrasi DNA darah lebih besar dibandingkan dengan LCL. Hal ini mungkin karena konsentrasi DNA template virus dalam darah jauh lebih sedikit dibandingkan dengan kadar DNA dari LCL. Darah banyak mengandung sel-sel yang

mempunyai inti, sedangkan LCL terdiri atas limfosit B yang terinfeksi EBV yang dapat memperbanyak diri sehingga konsentrasi DNA template virus lebih banyak dibandingkan dengan darah langsung. Kieff (1996) melaporkan bahwa virus EBV menginfeksi sel B hanya 1 dalam 1 juta sel limfosit B. Beberapa sampel yang menunjukkan pita yang spesifik dengan kondisi sama, menunjukkan ketebalan/intensitas band yang berbeda. Perbedaan ini mungkin disebabkan oleh perbedaan intensitas band yang dihasilkan dari jumlah DNA target yang berbeda. Jumlah DNA yang banyak menunjukkan intensitas band lebih tinggi. Untuk mengetahui urutan DNA dilakukan sekuensing. DNA yang telah teramplifikasi dengan PCR itu kemudian dipurifikasi dan disekuensing dengan itu ABI 377 system Sequencer Machine di Lembaga Eijkman Jakarta. Hasil sekuen gen itu adalah sebagai berikut.

Sekuen gen pada bagian epitop CTL yang terkait dengan HLA-A24 dari LMP2A EBV ( epitop TYGPVFMCL) beserta sekuen asam aminonya dibandingkan dengan *Prototype* (B 95.8) adalah :



*Alignment* sekuen 5 isolat EBV yang diperoleh dari penderita dibandingkan dengan virus *prototype* (B 95.8) menunjukkan adanya perubahan sekuen nukleotida pada bagian epitop CTL yang terkait dengan HLA-A24. Perubahan ditunjukkan dengan anak panah.

Perubahan sekuen nukleotida terdapat pada tempat tertentu (asam amino tertentu). Sekuen gen pada bagian epitop CTL yang terkait dengan HLA-A24 (epitop TYGPVFMCL) menunjukkan adanya perubahan sekuen nukleotida G menjadi C sehingga asam amino yang disandi berubah dari asam amino sistein (C) menjadi serin (S) pada posisi 8 epitop. Selain itu, terdapat perubahan sekuen

nukleotida A menjadi C tetapi tidak menyebabkan perubahan asam amino (menyandi asam amino yang sama) pada posisi 4 epitop. Satu dari 5 isolat EBV menunjukkan perubahan sekuen nukleotida A menjadi G, T menjadi C, dan TC menjadi CG sehingga terjadi perubahan pembacaan secara berturut-turut dari asam amino metionin (M) menjadi valin (V), sistein (C) menjadi serin (S), dan leusin (L) menjadi Prolin (P) pada posisi 7, 8 dan 9 epitop. Perubahan itu tidak mengubah polaritas dan muatan asam amino dari polar menjadi polar tetapi kemungkinan menyebabkan perbedaan kemampuan mengikat (*binding*) dengan asam amino HLA karena sifat polaritas setiap asam amino berbeda. Daya ikat asam amino epitop Prototype kemungkinan lebih kuat bila sistein berikatan dengan sistein dari HLA yang membentuk ikatan disulfida sehingga lebih stabil. Perubahan sekuen asam amino pada epitop diatas kemungkinan mempengaruhi pengenalan CTL. Perubahan tersebut kemungkinan menyebabkan CTL tidak mengenali kompleks itu. Khanna *et al.* (1997) menyatakan bahwa perubahan asam amino di *anchor* menyebabkan tidak terjadi pengikatan epitop dengan HLA, CTL tidak mengenali epitop dan perubahan pada bagian tengah yang mengikat TCR CTL mengenali epitop secara tidak optimal.

Lee *et al.* (1993) telah melaporkan adanya perubahan sekuen gen pada epitop CTL yang terkait dengan HLA-A2.1 ( epitop CLGGLTMMV) dari LMP2A isolat EBV yang berasal dari Asia Tenggara yang menyebabkan perubahan asam amino sistein menjadi serin pada posisi 1 epitop dan perubahan asam amino leusin menjadi isoleusin pada posisi 6 epitop CTL LMP2A isolat EBV Afrika dan Caucasia.

## KESIMPULAN

Dari penelitian dapat disimpulkan bahwa gen LMP2A EBV pada epitop CTL yang terkait dengan HLA-A24 (epitop TYGPVFMCL) menunjukkan perubahan nukleotida dibandingkan dengan *Prototype* (B 95.8).

Perubahan nukleotida pada setiap gen LMP 2A bagian epitop CTL sebagian besar dijumpai pada basa tertentu yang menyandi asam amino berbeda, yaitu perubahan nukleotida yang menyandi asam amino posisi 8 pada epitop TYGPVFMCL.



## DAFTAR PUSTAKA

- Apolloni, A., D.J. Moss, R. Stumm, S. Burrows, A. Suhrbier, I. Misko, C. Schmidt, and T. Sculley. 1992. Sequence variation of cytotoxic T cell epitopes in different isolates of Epstein-Barr Virus. *Eur. J. Immunol.* 22:183-189.
- Ausubel, F..M., R. Brent, R.E. Kingston, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Strul. 1996. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Willey & Sons, Inc. Vol 1. pp. 7.03-7.07.
- Innis, M.A and D.H. Gelfand. 1990. "Optimization of PCRs", PCR protocol. *A Guide to Methods and Applications* (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., ed), Academic Press, Inc. San Diego.
- Khanna, R., S.R. Burrows, S.L. Silins, D.J. Moss, L.M. Poulsen, and J.M. Burrows. 1996. Cytotoxic T- lymphocyte clones spesific for an immunodominant epitope display discerning antagonistic response to naturally occuring epstein-Barr Virus. *J. Virol.* 70.(10): 7306-7311.
- Khanna, R., S. R. Burrows, D.J. Moss, and S.L. Silins. 1996. Peptide transporter (TAP-1 and TAP-2)-independent endogenous processing of Epstein- Barr Virus (EBV) Latent Membrane Protein 2A: Implication for cytotoxic T-lymphocyte control of EBV-associated malignancies. *J. virol.* 70.(8): 5357-5362
- Khanna, R., S.R. Burrows, and J.M. Burrows. 1997. The role of cytotoxic T lymphocytes in the evolution of genetically stable viruses. *Trend in Microbiology.* 64.5(2).p. 1-7
- Khanna, R., S.R. Burrows, A. Neisig, J.M. Burrows, D..J. Moss, and S. L. Silins. 1997. Hierarchy of Epstein-Barr Virus-spesific cytotoxic T-cell response in individuals carrying different subtypes of an HLA-allele: Implications for epitope-based antiviral vaccine. *J. Virol.* 71.(10): 7429-7435.
- Kienzle N., T.B. Scully, L. Poulsen, M. Buck, S. Cross, N.R. Traub, and R. Khanna. 1998. Identification of cytotoxic T-lymphocyte response to the novel BARVO protein of Epstein-Barr Virus: A critical role for antigen expression. *J. Virol* 72(8):6614-6629.

- Lee, SP., W.A. Thomas, R.J. Murray, F. Kannon, S. Kaur, L.S. Young, M. Rowe, M. Kurilla, and Rickinson 1993. HLA-A2.1 restricted cytotoxic T cells recognizing a range of Epstein- Barr Virus isolates through defined epitope in latent membrane protein LMP2. *J. virol.* 67.(12):7428-7435.
- Munir, M. 1996. NPC and its problems. *Othorhinolaryng.* 27(4):518.
- Murray, P. R., E.J. Baron, M. A. Pfaller, F.C. Tenover, and R. H. Tenen. 1995. *Manual of Clinical Microbiology*. Sixth ed. ASM Press. Washington DC. p.905-910.
- Rickinson, A.B., D.J. Moss, J.H. Pope, and N. Ahlberg. 1980. Long-term T cell-mediated immunity to Epstein- Barr virus in man : IV. Development of T-cell memory in convalescent infectious mononucleosis patients. *Int. J. Cancer.* 25.: 59-65.
- Roetzin, A. 1999. Berbagai faktor penyebab dan predisposisi *Nasopharyngeal Carcinoma*. *MKI.* 49(3): 67-70.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F, and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Second edition, Cold Spring. Harbour Laboratory Press. New York.
- Soeripto., O.M. Jensen, and C.S. Muir. 1976. Cancer in Yogyakarta, Indonesia: relative frequencies. *Br. J. cancer.* 36 (141):141-148.
- Tamura, S., A. Yamazaki, M. Kumimoto, K. Takemura, T. Tabata, Y. Hinuma, and O. Yosie. 1992. Impaired long-term T cell immunity to Epstein- Barr virus in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Jpn.J.cancer Res.* 83 (5): 445-449.